

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON
ANTIKÖRPERN UND VON ZIRKULIEREN-
DEN ANTIGENEN AN EXPERIMENTELL
MIT BABESIA DIVERGENS INFIZIERTEN
UND AN BABESIOSEVERDÄCHTIGEN
RINDERN MIT DEM ENZYME-LINKED-
IMMUNOSORBENT-ASSAY (ELISA)

Johannes Rauch

1981

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN UND VON ZIRKULIERENDEN
ANTIGENEN AN EXPERIMENTELL MIT BABESIA DIVERGENS INFIZIERTEN
UND AN BABESIOSEVERDÄCHTIGEN RINDERN MIT DEM ENZYME-
LINKED-IMMUNSORBENT-ASSAY (ELISA)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Johannes Rauch
aus
Wohnsig

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:..... Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent:..... Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

Korreferent:..... Prof. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion:..... 27. Februar 1981



DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Die Serodiagnostik der Babesiose des Rindes und der serologische Nachweis zirkulierender Antigene bei parasitären Infektionen (anhand der Literatur) . . .	2
III. Eigene Untersuchungen	12
A. Material und Methodik	12
B. Ergebnisse	21
1. Nachweis zirkulierender Antikörper und Antigene in experimentell mit Babesia divergens infizier- ten Rindern	21
2. Untersuchung von Feldseren aus bestimmten Ge- bieten Südbayerns auf zirkulierende Antikörper und Antigene	24
IV. Diskussion	28
V. Zusammenfassung und Summary	36 37
VI. Literaturverzeichnis	38
Lebenslauf	

I. Einleitung

Die Diagnose der Babesieninfektion wurde in der Praxis bisher aufgrund des klinischen Bildes und durch den direkten Erregernachweis im gefärbten Blutaussstrich geführt. Da die Parasiten in der latenten Infektionsphase im Blut meist nicht nachzuweisen sind, setzen sich immer mehr serologische Methoden durch. Zum Nachweis zirkulierender Antikörper, die allerdings oft noch Wochen bis Monate nach der vollständigen Heilung vorhanden sind. Bei verschiedenen Parasitosen (Schistosomiasis, Trypanosomiasis, Toxoplasmose) lassen sich auch Stoffwechselprodukte (=zirkulierende Antigene) im Wirtsserum nachweisen. Dies läßt ein klareres Urteil über den tatsächlichen Infektionsstatus eines Wirtes zu, da Stoffwechselprodukte nur in Anwesenheit des Parasiten, Antikörper aber noch Monate nach der Heilung nachweisbar sind. Neuerdings ist es möglich, mit Hilfe von Gerbils (*Meriones unguiculatus*) *Babesia divergens*-Infektionen des Rindes auch im Tierversuch sicher zu diagnostizieren.

Das Ziel meiner Arbeit war es, an experimentell mit *Babesia divergens* infizierten Rindern den Nachweis zirkulierender Antikörper und Antigene mit dem ELISA zu erbringen. Anhand einer größeren Anzahl von Rinderseren aus bestimmten Gebieten Südbayerns sollte die ELISA-Technik für den Antikörper- und Antigennachweis hinsichtlich ihrer praktischen Anwendbarkeit überprüft werden.

II. Die Serodiagnostik der Babesiose des Rindes und der serologische Nachweis zirkulierender Antigene bei parasitären Infektionen (anhand der Literatur)

Der direkte Erregernachweis bei der Rinderbabesiose gelingt meist nur während der akuten Infektionsphase (JACOB, 1939). Aber auch hier kann man z.B. bei einem Rind mit deutlichen Symptomen der Babesiose im allgemeinen nur in 8 von 40 angefertigten Blutaussstrichen vereinzelt Piroplasma finden. In den letzten Jahren gewann der indirekte Erregernachweis zur Erkennung latenter Infektionen an Bedeutung; insbesondere wird der Nachweis spezifischer Antikörper mit Hilfe serologischer Tests versucht.

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) wurde als erste serologische Methode bei der Diagnose von Babesiosen eingesetzt. HIRATO und Mitarb. (1945) konnten bei der *B. caballi*-Infektion eines Pferdes komplementbindende Antikörper nachweisen. Auch MAHONEY (1962, 1964, 1967) stellte bei *B. argentina*- und *B. bigemina*-Infektionen des Rindes Antikörper fest, die lange im Serum persistierten. Er berichtet aber, ebenso wie TODOROVIC (1975), von Schwierigkeiten bei der Anwendung des Testes wegen seiner geringen Empfindlichkeit.

GOLDMANN und BUKOWSKI (1975) wandten die Gelpräzipitation bei *B. bigemina*-Infektionen an. Bei Vergleichsuntersuchungen erzielten sie mit der Immunofluoreszenz eine Übereinstimmung bei 72 % der untersuchten Seren. Den Kapillarröhrchen-Agglutinationstest (KA) zur Routineuntersuchung bei *B. bigemina*-Infektionen entwickelten LÖHR und ROSS (1979). Ebenso gut geeignet für die Praxis scheinen der von TODOROVIC und KUTTLER (1974) eingeführte und nach 5 Minuten bereits ablesbare *Babesia* Card Agglutination-Test (BCT) und der Rapid-Latex-Agglutinationstest (RLT) von LOPEZ und TODOROVIC (1978). Sie wurden zum Antikörpernachweis bei *B. bigemina*- und *B. argentina*-Infektionen benutzt.

Die am häufigsten angewandten serologischen Verfahren für die Diagnose von Babesieninfektionen sind jedoch der indirekte Fluoreszenzantikörpertest (IFAT), der indirekte Hämagglutinationstest (IHA) und der immer mehr angewandte Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA). Sie zeigen eine große Spezifität und Sensitivität und erbringen Titer noch lange Zeit nach einer einmaligen Infektion.

Mit dem IFAT wiesen ROSS und LÖHR (1968) Antikörper noch 2 Jahre nach einer *B. bigemina*-Infektion nach. DONNELLY und Mitarb. (1972) beobachteten Titer bei Rindern, welche eine *B. major*- bzw. *B. divergens*-Infektion überstanden hatten. Auch bei Vergleichsuntersuchungen von TODOROVIC und LONG (1976) war der IFAT beim Nachweis von *B. bigemina*- und *B. argentina*-Antikörpern empfindlicher als die KBR. Mit dem IFAT konnten 4 (*B. argentina*) bzw. 2 1/2 Wochen (*B. argentina*) früher als mit der KBR Antikörper erfaßt werden. ADAM und BLEWETT (1978) untersuchten 22044 Serumproben von Rindern aus Schottland mit dem IFAT; dabei reagierten 2522 Seren (11 %) positiv.

Der indirekte Hämagglutinationstest (IHA) wurde von CURNOW und CURNOW (1967) zum Nachweis von Antikörpern bei einer *B. argentina*-Infektion erfolgreich eingesetzt. Auch GOODGER (1971) verwendete ihn bei mit *B. bigemina* und *B. argentina* infizierten Rindern. GOODGER und MAHONEY (1974) konnten sogar noch 4 Jahre nach der einmaligen Infektion mit *B. argentina* in 21 von 22 Rinderseren Babesienantikörper nachweisen.

Den von ENGVALL und PERLMANN (1972) entwickelten Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) wandten erstmals PURNELL und HENDRY (1976) zur Diagnose einer *B. divergens*-Infektion an. Sie konnten 3 - 6 Tage nach dem Höhepunkt der Parasitämie maximal Antikörper nachweisen.

Sie verwendeten einen somatischen Extrakt von *B. divergens* als Antigen und p-Nitrophenylphosphat als Substrat. Bei 3 experimentell infizierten Rindern stellten sie die höchsten Extinktionswerte 13 Tage p.i. fest. Diese Werte blieben bis zwei Monate nach der Infektion deutlich über den Werten von Seren nicht-infizierter Rinder. Bei Vergleichsuntersuchungen fanden BIDWELL und Mitarb. (1978) den ELISA empfindlicher gegenüber der KBR, objektiver gegenüber dem IFAT und bei Feldtests leichter zu handhaben. WEILAND und DOHNA (1978) stellten mit Hilfe des ELISA Antikörper gegen *B. galagolata*, *B. rodhaini* und *B. canis* in Mäusen, Kaninchen und Hunden fest; als Antigen benutzten sie *B. rodhaini*. KRATZER (1979) konnte im ELISA mit somatischem *B. rodhaini*-Antigen bei experimentell mit *B. divergens* infizierten Rindern Titer nachweisen.

Vergleichende Untersuchungen mit dem IHA, IFAT und ELISA stellte REIF (1980) bei 3 experimentell mit *B. divergens* infizierten Rindern an. Ab dem 5. Tag p.i. konnte er in allen 3 Tests die Antikörperbildung bei 2 Tieren nachweisen; beim dritten Rind reagierten ELISA und IHA erst 7 Tage p.i.. Maximaltiter erreichten die Seren im IFAT zwischen dem 20. und 33. Tag p.i., im IHA zwischen dem 12. und 28. Tag p.i. und im ELISA zwischen dem 17. und 34. Tag p.i.. Auch wenn die Titer danach abfielen, blieben sie lange Zeit bestehen. Nach einer diagnostischen Entmilzung am 164. Tag p.i. trat einige Tage lang wieder eine Parasitämie auf, ebenso stiegen die Antikörpertiter bei allen 3 Nachweismethoden um 1 - 2 Stufen an. Auch nach einer dreimaligen Behandlung von 2 Rindern mit 7,5 mg/kg Berenil zwischen dem 177. und 181. Tag p.i. waren über den 250. Tag p.i. hinaus noch Antikörper nachweisbar, obwohl im Tierversuch mit Gerbils (LEWIS und WILLIAMS, 1979) keine Rückisolierung von *B. divergens* mehr möglich war. Als Antigen für seine Tests verwendete er *B. rodhaini* aus Mäusen, im IHA darüberhinaus auch *B. divergens*-Antigen.

Bei der Untersuchung von 1291 Rinderseren aus für Babesiose verdächtigen Gebieten Südbayerns (Voralpengebiet) reagierten 26 % im ELISA und 24,2 % im IHA mit *B. rodhaini*-Antigen, 23,1 % im IHA mit *B. divergens*-Antigen positiv. Dabei ergab sich eine Übereinstimmung mit dem ELISA bei 85 % bzw. bei 82,5 % der Seren. Bei dem mit verschiedenen Antigenen durchgeführten IHA stimmten 77,8 % der untersuchten Seren überein. Die Titerstufen der im ELISA getesteten Seren drückte er in MONA- (Multiple of normal activity) Werten aus. Diese von FELGNER (1978) beschriebene MONA-ELISA-Technik stellt eine stufenlose Antikörperbestimmung dar, die gegen ein normales Sammelserum gemessen wird.

Hochinteressant war bei verschiedenen Parasiteninfektionen von Mensch und Tier vor allem während der akuten Infektionsphase der Nachweis von Antigen im Serum. So konnten mit Hilfe der Immunelektrophorese BERGGREN und WELLER (1967) zum ersten Mal ein spezifisches zirkulierendes Antigen bei *Schistosoma mansoni*-Infektionen nachweisen. Im Plasma stark infizierter Mäuse wurde 26 Tage p.i. eine neue Präzipitationslinie festgestellt. Ebenso trat im Plasma von Hamstern, die massiv mit *Schistosoma* infiziert waren, eine positive Reaktion 26 Tage p.i. auf. Dieses zirkulierende Antigen war bis zum Tod der Tiere (44 - 54 Tage p.i.) im Plasma vorhanden. Das Erscheinen des Antigens im Serum hing von der Dauer der Infektion und der Wurmmenge in den Tieren ab. Das im Serum vorkommende Antigen entsprach dem in *Schistosoma mansoni*-Homogenaten. Auch GOLD, ROSEN und WELLER (1969) konnten mit der Ouchterlony-Immuddiffusion im Serum von 71 mit *Schistosoma mansoni* infizierten Hamstern ein spezifisches Antigen feststellen. Als Antiserum wurde Serum von mit einem Wurmhomogenat immunisierten Kaninchen benutzt. Die Serumproben wurden zwischen der 5. und 7. Woche p.i. gesammelt. Bei allen positiv reagierenden Tieren (88 % von 83) wurden mehr als 50 Würmer gefunden. Die Autoren stellten eine Korrelation zwischen der Wurmanzahl in den infizierten Hamstern und der Antigenmenge im Serum fest. Das im Serum nachgewiesene Antigen konnte auch im Urin infizierter Hamster gefunden werden.

BAWDEN und WELLER (1974) verwendeten für den Nachweis von zirkulierendem Antigen bei *Schistosoma mansoni*-Infektionen in Hamstern und Mäusen die KBR. Die ersten positiven Reaktionen erhielten sie am 18. Tag p.i. bei Hamstern, die mit je 800 Zerkarien infiziert worden waren. Die KBR erwies sich als wesentlich empfindlicher für den Nachweis zirkulierender Antigene bei *Schistosoma mansoni*-Infektionen als die Immundiffusion.

SANTORO, VANDENMEULENBROUCKE und CAPRON (1979) benutzten zum Antigennachweis im Serum von mit *Schistosoma mansoni* infizierten Mäusen den Radioimmunoprecipitation-polyethylene glycol assay (REPEGA). Zwischen 45. und 100. Tag p.i., mit einem deutlichen Abfall am 75. Tag nach der Infektion, war zirkulierendes *Schistosoma*-Antigen (CSA) im Serum vorhanden. Gleichzeitige Untersuchungen auf zirkulierende Immunkomplexe im Serum der infizierten Tiere mit der KBR bzw. mit dem I-labeled Cl_q -binding test ergaben zwischen dem 40. und 70. Tag p.i. bzw. ab dem 50. Tag p.i. die höchsten Titer. Bei Überprüfungen an mit *Schistosoma haematobium* und *Schistosoma mansoni* infizierten Menschen wurde von MADVAR und VOLLER (1977) u.a. auch der ELISA eingesetzt. Von 35 Patientenseren, die bei der Double countercurrent immunoelektrophoresis (D.C.IE) zirkulierendes Antigen enthielten, waren im ELISA 22 positiv. Von 44 in der D.C.IE negativen Seren zeigten 4 im ELISA positive Reaktionen. FERREIA und Mitarb. (1979) standardisierten die ELISA-Technik für den Nachweis von *S. mansoni*-Polysaccharid- und Proteinantigenen im Serum infizierter Mäuse. Als Antiseren wurden ein Serum gegen Polysaccharidkomponenten (P) und eines gegen Proteinkomponenten von *S. mansoni* (M) aus Schafen benutzt. Die Polystyrolwände der Platten wurden mit Verdünnungen der Globulinfraktionen von P oder M beschichtet und über Nacht in den Kühlschrank (4°C) gestellt. Nach dem Auswaschen pipettierten die Autoren die Seren infizierter Mäuse in die Vertiefungen der Platten und inkubierten sie 2 Std. bei 37°C. Als Konjugat diente die mit Peroxydase gekoppelte Gamma-Globulinfraktion von P oder M. Als Substrat verwendeten die Autoren

o-Dianisidin 1 %ig in Methanol. Mit dieser Methode konnten sie *S. mansoni*-Proteinantigene in einer Konzentration von 6 µg/ml und *S. mansoni*-Polysaccharidantigen in einer Konzentration von 3 µg/ml nachweisen.

Im Serum von Schimpansen, die mit *Schistosoma japonicum* infiziert waren, konnte HILLYER (1976) 4 bis 30 Wochen nach der Infektion bis zu 3 verschiedene Parasitenantigene mit der Ouchterlony-Immuddiffusion nachweisen, die mit einem *Schistosoma mansoni*-Antiserum reagierten. Zwischen der 6. und 9. Woche p.i. waren in den Seren von allen 12 infizierten Schimpansen zirkulierende Antigene zu finden; in der 30. Woche p.i. konnten nur noch bei 3 Tieren Wurmantigene im Serum erfaßt werden.

Den ELISA wandten AMBROISE-THOMAS, DESGEORGES und BOUTTAZ (1980) zum ersten Mal bei der Serodiagnose der Fasciolose an. Während beim Antikörpernachweis keine signifikanten Unterschiede zwischen Seren von infizierten und Seren von gesunden Rindern festzustellen waren, gelang es den Autoren, mit der ELISA- Sandwich-Technik zirkulierende Antigene in Seren infizierter Tiere nachzuweisen. 15 von 17 (88,2 %) Seren von Rindern, bei denen eine *Fasciola hepatica*-Infektion bei der Schlachtung festgestellt wurde, reagierten positiv; 2 Seren zeigten ein zweifelhaftes Ergebnis. Von 263 fasciolafreien Rindern reagierten 0,7 % der Seren positiv, 5,2 % zweifelhaft. Auch bei einem mit Immunsuppressiva behandelten Fasciolose-Patienten konnte im Serum Fasciolaantigen nachgewiesen werden, das erst 2 Monate nach der Behandlung verschwand.

Im Serum von Ratten, die mit *Trypanosoma brucei* infiziert waren, fand WEITZ (1960) erstmals ein lösliches Antigen. Da es nicht an den Parasiten gebunden war, bezeichnete er es als "Exoantigen". Der Autor konnte nachweisen, daß die Exoantigene immunogen sind. GRAY (1966) fand auch bei *T. vivax*- und SIQUEIRA und Mitarb. (1966) bei *T. cruzi*-Infektionen

Exoantigene. D'ALESSANDRO (1972) wies im Serum und im Plasma von mit *T. lewisi* infizierten Ratten mit der Agargel-Diffusionstechnik Exoantigene nach. Als Antiseren verwendete er Rattenhochimmuns-
serum und Kaninchenserum, die mit lebenden Trypanosomen immunisiert worden waren. Er zeigte, daß die Exoantigene kontinuierlich während der Infektion in das Serum abgegeben werden, daß sie aber während des natürlichen Infektionsverlaufes nicht immunogen sind.

DWYER (1977) identifizierte Exoantigene von *T. lewisi* mit immunochemischen Methoden als Bestandteile der Oberflächenmembran der Parasiten.

Mit der Counterimmunoelektrophorese konnte ARAUJO (1976) zirkulierende Antigene im Plasma von Mäusen mit akuter *Trypanosoma cruzi*-Infektion nachweisen. Als Antiserum benutzte er Serum von Ratten oder Mäusen, die latent mit *T. cruzi* infiziert waren. 5 Tage p.i. wurden die Antigene erstmalig nachgewiesen und ihre Menge schien bis zum 12. Tag p.i., an dem alle Tiere der Infektion erlagen, anzusteigen. Es gelang aber nicht, Exoantigene im Plasma von latent infizierten Mäusen nachzuweisen. Bei Untersuchungen über die immunologischen Eigenschaften zirkulierender Antigene aus dem Plasma mit *T. cruzi* infizierter Mäuse stellten ARAUJO, NASCIMENTO und MORATO (1978) fest, daß Exoantigene erst 4 Tage nach Auftreten der Parasitämie in der Geldiffusion und mit der Gegenstromelektrophorese zu erfassen waren. Die Menge der zirkulierenden Antigene korrelierte mit der Höhe der Parasitämie. Immunisierungsversuche mit Exoantigenen enthaltendem Plasma zeigten, daß zirkulierende Antigene Mäuse gegen *T. cruzi*-Infektionen schützten, wenn das Plasma 3 Wochen vor der Infektion injiziert wurde.

Zirkulierendes Antigen bei einer Toxoplasmainfektion wiesen erstmalig RAIZMAN und NEVA (1975) nach. Sie fanden im Serum experimentell infizierter Mäuse, die 4 Tage nach der Infektion starben, 2 Tage p.i. mit der Countercurrentimmunoelektrophorese und der Agargel-diffusion Exoantigen von *Toxoplasma gondii*. Im Serum infizierter Ratten,

die 8 Tage nach der Infektion starben, konnten die Autoren zirkulierendes Antigen 3 - 8 Tage p.i. erst nach Affinitätschromatographie mit der Countercurrentimmunelektrophorese nachweisen. In den Rattenserum konnten am 7. und 8. Tag p.i. mit dem Sabin-Feldmann-Test auch Toxoplasmaantikörper nachgewiesen werden. VAN KNAPEN und PANGGABEAN (1977) wandten den ELISA zum Antigennachweis im Serum bei Toxoplasmose an. Schon einen Tag nach der Infektion konnten sie die Anwesenheit von zirkulierendem Antigen feststellen, obwohl die Parasitämie erst 2 Tage p.i. auftrat. 3 Tage p.i. reagierten die Seren noch in einer Verdünnung von 1:100. In 5,7 % von 1116 Patientenserum, die wegen Verdacht auf Toxoplasmose routinemäßig auf Antikörper untersucht wurden, wiesen sie mit der ELISA-Sandwich-Technik zirkulierendes Toxoplasmaantigen nach. In Verbindung mit IgG-Antikörper- und IgM-Antikörperrnachweis kann mit dem Antigennachweis im Serum die Diagnose einer akuten Toxoplasmose abgesichert werden. Bei der Untersuchung von 23 Seren von Patienten mit seit kurzem bestehender akuter Toxoplasmose im ELISA konnten ARAUJO und REMINGTON (1980) in 15 Seren (65,2 %) zirkulierendes Toxoplasmaantigen nachweisen. 28 Seren, die in Sabin-Feldmann-Test negativ waren, enthielten auch kein Antigen. Ebenso fanden die Autoren in 55 Seren latent mit *T. gondii* infizierter Menschen kein Antigen. Die F(ab)₂-Fraktion von mit Toxoplasma infizierten Kaninchen erbrachte als Antiserum die besten Ergebnisse.

WILSON und Mitarb. (1969) entdeckten während der akuten Phase einer *P. falciparum*-Infektion beim Menschen ein im Blut der erkrankten Personen zirkulierendes Antigen. SEITZ (1976) konnte im Serum bei mit *P. berghei* infizierten Mäusen mit Hilfe der zweidimensionalen Immundiffusion Plasmodienantigene nachweisen. Die ersten Präzipitationslinien traten, je nach Infektionsdosis und Erregerstamm, 6 - 10 Tage p.i. auf. 17 - 20 Tage p.i. konnten bei allen Seren 7 Präzipitationslinien festgestellt werden, die bis zum Tod der Tiere bestehen blieben. Bei gleichzeitig durchgeführten

Untersuchungen mit dem IFAT ließen sich schon in der ersten Infektionswoche Antikörper nachweisen, die in der 2. bis 3. Woche p.i. die höchsten Werte erreichten. Antikörper gegen die im Serum auftretenden Antigene konnten nur in immunen Tieren festgestellt werden. Antigene, die durch Desintegration von Parasitenmaterial gewonnen wurden, stimmten nur zum Teil mit den im Serum zirkulierenden Antigenen überein.

Nicht das im Serum zirkulierende Antigen, sondern das in den Erythrozyten vorhandene Antigen wiesen MACKAY und Mitarb. (1980) serologisch mit dem Radioimmunoassay nach. Bei mit *P. berghei* infizierten Mäusen konnten sie bei der Verwendung homologer Antiseren eine Infektion noch bei einer Parasitendichte von 1 Parasit/10⁶ Erythrozyten nachweisen.

SIBINOVIC und Mitarb. (1965) beobachteten zwischen dem Serum eines Pferdes mit akuter Babesiose (*B. caballi*) und dem Serum eines genesenden Pferdes bei der Doppelgelddiffusion eine Präzipitationslinie. Das Serumantigen verschwand ungefähr einen Monat nach der Infektion. Nach drei Monaten wurden Antikörper gegen dieses zirkulierende Antigen festgestellt, die nahezu 7 Monate persistierten. MAHONEY (1966) wies im Serum von Rindern, die zur Antigengewinnung für die KBR massiv mit *B. argentina* oder *B. bigemina* infiziert waren, mit der Geldiffusion zirkulierendes Antigen nach. Als Antiserum diente ihm Kaninchenimmunserum, das vorher mit normalem Rinder Serum absorbiert wurde. Im Falle einer *B. argentina*-Infektion fand er 3, bei einer *B. bigemina*-Infektion nur 2 Präzipitationslinien. Da nur eine Präzipitationslinie beiden Systemen gemeinsam war, mußte das Serumantigen parasitischen Ursprungs sein.

MAHONEY und GOODGER (1969) charakterisierten zwei bei der Gelpräzipitation in Seren von frisch mit *B. argentina* infizierten Kälbern gefundene Substanzen. Die eine war immunologisch identisch mit bovinem Fibrinogen, die zweite Substanz war ein pigmentierter Makromolekül-

komplex, dessen Proteinanteil auch in Geweben von normalen Rindern gefunden wurde. Das Serum eines Kalbes mit durch Chemikalien ausgelöster hämolytischer Anämie enthielt die gleiche Substanz, weshalb die Autoren sie nicht für parasitenabhängig hielten.

III. Eigene Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wird über ELISA-Techniken zum Antikörper- und Antigennachweis bei *B. divergens*-Infektionen bei Rindern berichtet. Der ELISA wurde gewählt, da er sich bei der Serodiagnostik von anderen parasitären Infektionen als sehr empfindlich erwiesen hat.

A) Material und Methodik

Um Antikörper und Antigene im Serum von mit *Babesia divergens* infizierten Rindern nachweisen zu können, infizierte ich 2 männliche Rinder der Rasse Deutsche Schwarzbunte. Beide waren bei Versuchsbeginn 3 Monate alt und ausschließlich im Stall gehalten worden, so daß ich davon ausgehen konnte, daß sie nicht auf natürlichem Wege mit *Babesia divergens* infiziert waren. Während des Versuchs wurden die Tiere in einem Laufstall mit Einstreu gehalten. Gefüttert wurden sie mit Heu und Wasser ad libitum sowie täglich 250 g Kraftfutter. Außerdem stand ein männliches Rind der Rasse Deutsche Schwarzbunte aus einem früheren Infektionsversuch zur Verfügung. Dieses Tier war 18 Monate alt, ein Jahr vor Beginn meiner Untersuchungen mit *B. divergens* infiziert und 11 Tage p.i. splenektomiert worden und Parasitenträger geblieben. Es wurde im Anbindestall mit Einstreu bei 18° - 20° C gehalten.

Zur Überprüfung des Infektionserfolges bei den Rindern benutzte ich Gerbils (*Meriones unguiculatus*) aus institutseigener Zucht. Sie wurden in Makrolonkäfigen bei einer Raumtemperatur von 20° C gehalten, und mit Altromin-Mäusestandarddiät gefüttert und erhielten Wasser ad libitum.

Zur Antigengewinnung verwendete ich Gerbils und NMRI-Mäuse aus institutseigener Zucht, die unter den obigen Bedingungen gehalten wurden.

Für die Herstellung eines spezifischen Hochimmunerums benutzte ich Kaninchen und eine Zwergziege des Institutes. Die Kaninchen wurden einzeln in Käfigen gehalten und erhielten Altromin-Kaninchenstandardfutter und Wasser ad libitum. Die Ziege war mit der Herde in einem offenen Laufstall untergebracht.

Als Infektionsmaterial verwendete ich für Rind 1 eine Erythrozyten-suspension aus 500ml Blut des ein Jahr vorher mit *B. divergens* infizierten Rindes. Rind 2 infizierte ich mit einer Erythrozytensuspension, die ich aus 3,5ml Blut von massiv infizierten Gerbils gewann. Die Gerbils hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Parasitämie von 800⁰/oo. Das Blut wurde zentrifugiert, das Plasma entfernt und das Sediment dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend resuspendierte ich die Erythrozyten mit PBS auf das anfängliche Volumen und injizierte es den Rindern i.v.. Zur Kontrolle des Infektionsverlaufes machte ich nach Giemsa gefärbte Blutausstriche aus Peripherieblut. Für die Serumgewinnung zum Antikörper- und Antigennachweis entnahm ich in den ersten zwei Wochen nach der Infektion täglich und dann dreimal pro Woche Blut aus der V. jugularis.

Um den Verlauf der Infektion bei den experimentell infizierten Rindern auch nach Ablauf des Parasitämiestadiums zu überprüfen, injizierte ich 2ml Zitratblut i.p. Gerbils und kontrollierte täglich mit nach Giemsa gefärbten Blutaussstrichen den Infektionsverlauf. Die meisten Gerbils waren am 4. Tag p.i. parasitologisch positiv; nach 6 Tagen zeigten sie klinische Symptome einer Babesiose, wie Mattigkeit und Hämoglobinurie. Am 8. Infektionstag erlagen die ersten Tiere der Infektion, nach 10 Tagen waren alle Gerbils tot. Kurz vor dem Tod waren 800 - 900⁰/oo der Erythrozyten von Babesien befallen.

Zur Antigengewinnung züchtete ich *Babesia rodhaini* in NMRI-Mäusen und *Babesia divergens* in Gerbils (*Meriones unguiculatus*). Die NMRI-

Mäuse wurden mit jeweils 0,2ml babesienhaltigen Mäuseblut i.p. infiziert. Das Infektionsmaterial stammte aus Mäusen, die bei der Blutentnahme eine Parasitämie von 850⁰/oo aufwiesen. Zur Kontrolle des Infektionsverlaufs entnahm ich täglich Blut aus der Schwanzspitze und fertigte Blutaussstriche an, die ich nach Giemsa färbte. Auf dem Höhepunkt der Parasitämie 5 - 7 Tage p.i. tötete ich die Mäuse und blutete sie unter Zusatz von 3,8⁰/o-iger Natriumcitratlösung. Die Gerbils wurden mit je 2ml Rinderblut von dem vor einem Jahr splenektomierten Rind, das zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Blutausstrich keine Parasiten aufwies, i.p. infiziert. Täglich erfolgte die Kontrolle des Infektionsverlaufes. Die Gerbils wurden auf dem Höhepunkt der Parasitämie (8 Tage p.i.) getötet und geblutet.

Zur Gewinnung eines somatischen Extraktantigens wurden die Babesien durch Aqua-dest.-Hämolyse (Zugabe von 9 Teilen Aqua dest. zu ein Teil parasitenhaltigen Blutes) freigesetzt. Nach einer Minute stellte ich die Isotonie durch Zugabe eines gleichen Volumens doppelt physiologischen Phosphatpuffers wieder her. Das Hämolysat zentrifugierte ich 20 Minuten bei 10 000 Upm (= 15340g) und 4⁰ C in einer Sorvall-RC-2B-Zentrifuge mit einem SS-34-Rotor. Der Überstand wurde verworfen und das aus Erythrozytenteilen und freien Babesien bestehende Sediment in wenig PBS gelöst. Die Babesien wurden anschließend durch Ultraschall mit einem Sonifier^R-B 12 mit einer Ausgangsleistung von 40 - 60 Watt (Fa. Branson Sonic Power Company) zerstört und mit PBS 24 Stunden im Kühlschrank unter Rotation extrahiert. Die Aufbewahrung des Antigens erfolgte bei -20⁰ C. Die Eiweißbestimmung des Antigens führte ich nach der Methode von FOLIN-CLOALTEAU, modifiziert nach LOWRY durch.

Für die Herstellung von Hochimmenserum wurden 2 Kaninchen jeweils 1ml des somatischen Extraktes von *B. rodhaini* mit einer Proteinkonzentration von 4mg/ml, den ich mit 1ml kompletten Freundschens Adjuvans suspendierte, in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Nach 2 Wochen wiederholte ich diese Injektion, wiederum 4 Wochen später boosterte ich die Kaninchen durch Injektion von 1ml *B. rodhaini*-Antigen in

wäßriger Lösung in die Ohrvene. 10 Tage nach der Boosterung entnahm ich Blut aus der Ohrrendvene der Kaninchen und gewann das Serum. Die Zwergziege immunisierte ich nach dem gleichen Schema, nur injizierte ich ihr jeweils das doppelte Volumen. Für die intravenöse Injektion und die Blutentnahme benutzte ich die V. jugularis. Ein Teil des gewonnenen Hochimmuserums trennte ich säulenchromatographisch auf, um die IgG-Fraktion zu gewinnen. Dazu benutzte ich das Ultrogel Ac A 22 (Fa. LBK) mit einem effektiven Fraktionierungsbereich für globuläre Proteine eines Molekulargewichts von 100.000 - 1.200.000. Die Gelsäule war 50 cm hoch und hatte einen Durchmesser von 2,5 cm. Als Elutionsflüssigkeit diente ein weitgehend luftfrei gemachter Phosphatpuffer mit einem pH von 7,2. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 13ml pro Stunde. Die Elutionskurven wurden nach Messung bei 254nm im Uvicord II (Fa. LBK) geschrieben und die Fraktion automatisch im Ultro Rac (Fa. LBK) gesammelt. Anschließend testete ich die einzelnen Fraktionen im ELISA auf ihren Antikörpergehalt. Die Fraktionen, die den höchsten Antikörpergehalt aufwiesen, wurden zur Aufbewahrung lyophilisiert. Für die Proteinbestimmung der Fraktionen wendete ich die von LOWRY modifizierte Methode nach FOLIN-CIOCALTEAU an.

Für den Antikörpernachweis beschichtete ich die Kavitäten der Polystyrolmikrotiterplatten (Mikroelisa^R der Fa. Dynatech) mit Antigen, das eine Proteinkonzentration von 20µg/ml aufwies. Je 0,05ml Antigenlösung (mit PBS pH 7,2 verdünnt) wurden in die Kavitäten der Polystyrolplatten einpipettiert, 3 Stunden auf einem Taumelgerät bei 37⁰ C inkubiert und anschließend über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde die Antigenlösung mit Leitungswasser ausgewaschen.

Für die Verdünnung der zu untersuchenden Seren verwendete ich einen Phosphatpuffer (pH 7,2), dem zur Vermeidung unspezifischer Anlagerungen von Serumproteinen an die Polystyrolwände der Platten 0,5 % Humanserumalbumin und 0,05 % Tween 20 zugesetzt wurden. 0,025 ml Serum wur-

den mit diesem Puffer im Verhältnis 1:4 verdünnt und mit Mikrodilutern Verdünnungsreihen (1:8, 1:16, 1:32 usw.) in den Platten hergestellt. Danach wurden die Platten bei 37° C auf einem Taumelgerät eine Stunde lang inkubiert und mit Leitungswasser ausgewaschen. Um die Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen, verwendete ich ein mit Meerrettichperoxydase konjugiertes Antirind-Globulin (Rabbit-Anti-bovine-Globulin-PO; IgG₁, IgG₂ der Fa. Paesel) in einer Verdünnung von 1:1000. Dem als Verdünnungsmedium dienenden Phosphatpuffer mischte ich 4 % Humanserumalbumin und 0,05 % Tween 20 bei. Diese Zusätze verhinderten die unspezifische Anlagerung von Antiglobulin an die Kavitätenwände. In jede Kavität der Platten wurden 0,05ml dieser Suspension einpipettiert, die Platten eine Stunde bei 37° C auf dem Taumelgerät inkubiert und danach gründlich mit Leitungswasser ausgewaschen. Als Substrat für die Meerrettich-Peroxydase verwendete ich eine bei 70° C in Aqua dest. gelöste 0,08°/oo 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure, die mit 1N NaOH vor Gebrauch auf pH 6 eingestellt und im Verhältnis 1:10 mit 0,05 %-igem H₂O₂ vermischt wurde. Von diesem Gemisch wurden 0,1ml in jede Vertiefung der Platten pipettiert. Bei einer positiven Reaktion entstand ein brauner bis violetter Farbumschlag, der nach einer Stunde mit 0,05ml 1 N NaOH gestoppt wurde. Die photometrische Bestimmung der Extinktionen erfolgte in einem Iitertek^R-Multiskan bei 405nm mit automatischen Ausdruck der Extinktionswerte.

Für den Nachweis zirkulierender Babesienantigene eignen sich zwei ELISA-Techniken, die ich für meine Untersuchungen verwendete.

Das Prinzip des direkten Antigennachweises besteht darin, daß sich die im Serum infizierter Tiere zirkulierenden Babesienektoantigene an die Polystyrolwände der Plattenkavitäten anlagern, wo sie nach Zugabe eines spezifischen Antikörpers mit Hilfe der ELISA-Technik nachgewiesen werden können. Hierzu sind im einzelnen folgende Schritte des Testablaufes notwendig:

- Beschichtung der Platten mit 0,050ml Serum, in dem zirkulierende Antigene vermutet werden
- Inkubation (3 Stunden) bei 37⁰ C und Kältebindung über Nacht im Kühlschrank
- Auswaschen der Platten mit Leitungswasser
- Zugabe von 0,050ml spezifisch gegen das Antigen gerichteten Hochimmunerums (Verdünnung 1:50 in 0,5 % BSA-PBS mit 0,05 % Tween 20)
- Inkubation (1 Stunde) bei 37⁰ C
- Waschen
- Zugabe von 0,050ml eines gegen das Hochimmunerum gerichteten, mit Peroxydase markierten Antiglobulins (Verdünnung 1:1000 in 4 % BSA-PBS mit 0,05 % Tween 20)
- Inkubation (1 Stunde) bei 37⁰ C
- Waschen
- Zugabe von 0,1ml für die Peroxydase spezifischen Substrats
- Reaktionszeit (1 Stunde) bei Zimmertemperatur
- Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit 0,050ml 1N NaOH
- Photometrische Bestimmung der Extinktionen.

Die zu untersuchenden Seren titrierte ich in der zwei-fachen Verdünnungsreihe beginnend mit 1:1. Das spezifische Hochimmunerum (HIS) aus immunisierten Kaninchen verdünnte ich 1:50, da Platten mit dieser Verdünnung, die mit Babesienantigenen in einer Proteinkonzentration von 20µg/ml beschichtet waren, noch gleich hohe Extinktionswerte wie mit dem unverdünnten HIS zeigten. Dem zur Verdünnung benutzten Puffer (PBS, pH 7,2) setzte ich zur Vermeidung von unspezifischen Anlagerungen des Hochimmunerums an die Wände der Kavitäten 0,5 % bovinen Serumalbumin (BSA) und 0,05 % Tween 20 zu.

Als Konjugat verwendete ich ein mit Peroxydase markiertes Antikaninchenoglobulin (Anticorps Mouton, Antiglobulines de Lapin marques a la peroxydase der Fa. Institut Pasteur Production). Vorversuche hatten für das Konjugat eine Gebrauchsverdünnung von 1:1000 ergeben. Der Zusatz von 4 % BSA und 0,05 % Tween 20 diente dabei ebenfalls zur Verhinderung von unspezifischen Anlagerungen des Antiglobulins an die Polystyrolwände der Kavitäten.

Während der Inkubation wurden die Platten jeweils auf einem Taumelgerät bewegt, um einen optimalen Kontakt der Proteine mit den Kavitätenwänden zu erreichen.

Das Substrat für die Peroxydase bestand, wie beim Antikörpernachweis, aus 0,08⁰oiger 5-Aminosalicylsäure mit 0,05 % Wasserstoffsuperoxyd. Die photometrische Auswertung der Platten erfolgte ebenfalls im Titertek^R-Multiskan.

Das Prinzip des indirekten Antigennachweises mit Hilfe des Antikörperbindungs-Hemmungstests beruht darauf, daß der Antikörpertiter eines Hochimmunerums (HIS) nach Zugabe eines spezifischen Antigens durch Bildung von Immunkomplexen eine Titerreduktion erfährt, die mit der ELISA-Technik gemessen werden kann. Auf meine Untersuchungen übertragen heißt das, daß ein Probeserum, in welchem zirkulierendes Babesienantigen gesucht wird, mit einem HIS, das in einer bestimmten Verdünnung einen bekannten Extinktionswert hat, inkubiert und von dem nach Abzentrifugieren der Immunkomplexe die Änderung des Extinktionswertes gemessen wird.

Zu diesem Zweck versetzte ich die zu untersuchenden Rinderseren mit einem gegen Babesienantigene gerichteten HIS aus Kaninchen (in einer Verdünnung von 1:40) mit einem in einer Verdünnung von 1:400 gemessenen Extinktionswert von 0,870 im Verhältnis 10:1 und inkubierte dieses Gemisch eine Stunde bei 37° C. Mit diesen Verdünnungen kam ich in der Platte auf eine Verdünnung des HIS von 1:400. Diese Titerstufe zeigte bei der Austitrierung des HIS eine Extinktion von 0,870, die ungefähr halb so hoch war wie die höchsten Extinktionen des HIS (1,680). Der Restablauf umfaßte im einzelnen folgende Schritte:

- Zentrifugieren des inkubierten Serumgemisches (10 Minuten) bei 4000 UpM
- Verbringen des Überstandes (0,050ml) in die antigenbeschichteten Platten (Proteinkonzentration des Antigen 20µg/ml)
- Inkubation (1 Stunde) bei 37° C
- Waschen der Platten mit Leitungswasser
- Einfüllen von 0,050ml spezifisch gegen das Hochimmunerum gerichteten Antiglobulins (1:1000 in 4 % BSA-PBS mit 0,05 % Tween 20 verdünnt)
- Inkubation bei 37° C
- Waschen
- Zugabe von 0,1ml für die Peroxydase spezifischen Substrats
- Reaktionszeit (1 Stunde) bei Zimmertemperatur
- Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit 0,050ml 1N NaOH
- Photometrische Bestimmung der Extinktionen.

Das somatische Extraktantigen zur Beschichtung der Platten (Mikroelisa^R der Fa. Dynatech) wurde mit PBS (pH 7,2) so verdünnt, daß 1ml der Antigenlösung 20µg Protein enthielt. Diese Konzentration hatte sich aus Vorversuchen ergeben. Durch den Zusatz von bovines Serumalbumin (BSA) und Tween 20 zu dem Phosphatpuffer, mit dem ich das Hochimmunserum bzw. das Antiglobulin verdünnte, konnten unspezifische Anlagerungen von Serumproteinen bzw. Antiglobulin an die Kavitätswände der Platten verhindert werden. Konjugat und Substrat verwendete ich wie beim direkten Antigennachweis.

Um die Empfindlichkeit des Antikörperbindungs-Hemmungstests zu prüfen, inkubierte ich 0,050ml 1:200 verdünntes Hochimmunserum mit 0,050ml Antigenverdünnungen in steigenden Konzentrationen und bestimmte die restlichen nicht am Antigen gebundenen Antikörper. Zum Vergleich diente mir Hochimmunserum in einer Verdünnung von 1:400 ohne Antigenzusatz. Mit dieser Versuchsanordnung ließ sich eine Eichkurve erstellen, die bei einer Antigenkonzentration von 1µg/ml eine Extinktion von 0,830 ergab. Mit steigender Antigenkonzentration nahmen die Extinktionen kontinuierlich ab (Abb. 1). Wie aus der Kurve hervorgeht, ist ab einer Antigenkonzentration von 2µg/ml eine deutliche Abnahme der Extinktion festzustellen, das heißt, es konnten noch 0,1µg Antigen in 0,050ml Lösung nachgewiesen werden.

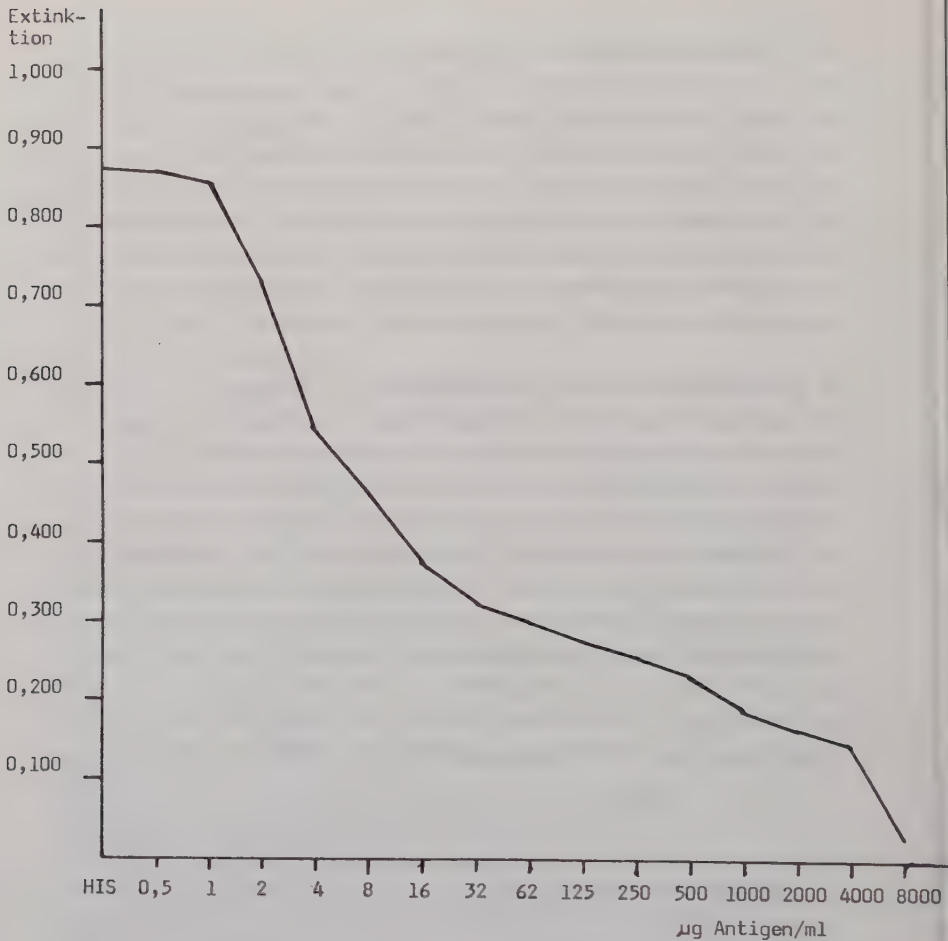


Abb. 1: Eichkurve für den Antikörperbindungs-Hemmungstest

Die Abszisse gibt die Konzentration der Antigenlösungen ($\mu\text{g Protein/ml}$) an, die mit einer gleichen Menge (50 μl) Hochimmuns serum inkubiert wurden.

Auf der Ordinate ist die Extinktion bei einer Verdünnung des HIS von 1:400 angegeben.

B. Ergebnisse

1. Nachweis zirkulierender Antikörper und Antigene in experimentell mit Babesia divergens infizierten Rindern

Bei den 2 von mir mit Babesia divergens infizierten Rindern konnte ich nur bei Rind 2, das mit Parasiten aus dem Gerbil infiziert worden war, im gefärbten Blutaussstrich am 5. und 6. Tag p.i. Erreger mit einer Parasitämie von $3^0/00$ nachweisen. Bei Rind 1, dem parasitierte Erythrozyten eines latent infizierten Rindes in die V. jugularis infundiert worden waren, gelang der Parasitennachweis im gefärbten Blutaussstrich nicht.

Um nachzuprüfen, ob die Infektion bei beiden Rindern angegangen war, übertrug ich einen Monat nach Versuchsbeginn Blut der Rinder auf Gerbils. Bei den mit Blut von Rind 2 beimpften Tieren stellte ich nach 4 - 5 Tagen, bei denen mit Blut von Rind 1 beimpften 5 - 6 Tage p.i. eine Parasitämie fest, die bis zum 11. Tag nach der Infektion eine Höhe von 600 - 700⁰/00 erreichte; alle 10 Tiere starben 12 - 14 Tage p.i. an der Babesien-Infektion.

Der Nachweis von Antikörpern gegen Babesia divergens konnte mit Hilfe des Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) sowohl mit dem somatischen B. rodhaini-Antigen als auch mit dem somatischen B. divergens-Antigen geführt werden. Das heterologe B. rodhaini- und das homologe B. divergens-Antigen reagierten gleichermaßen mit den B. divergens-Antikörpern; unterschiedliche Antikörpertiter traten nicht auf.

Rind 1 hatte einen Ausgangstiter (Leerwert) von 1:32; ein Titeranstieg trat bei diesem Tier erstmals 9 Tage p.i. um 1 Stufe auf. Am 13. Tag nach der Infektion wurde ein Maximalwert von 1:128 erreicht; bis zum Versuchsende (73 Tage p.i.) schwankte die Titerhöhe zwischen 1:64 und 1:128 (Abb. 2).

rezipr.
Verdün-
nungst.

256 1,400

128 1,200

64 1,000

32 0,800

16 0,600

8 0,400

4 0,200

- 22 -

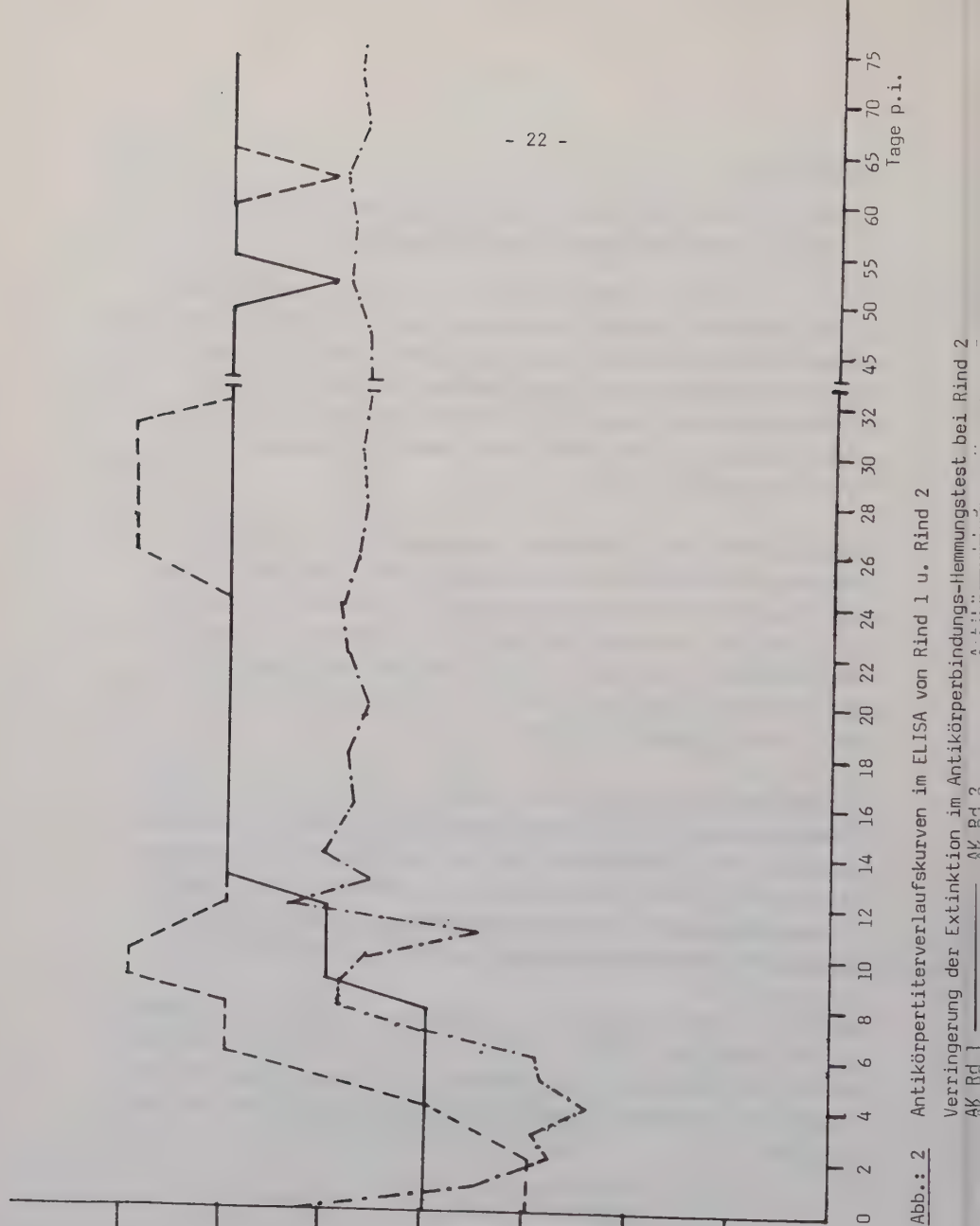
Tage p.i.

Abb.: 2 Antikörpertiterverlaufskurven im ELISA von Rind 1 u. Rind 2

Verringerung der Extinktion im Antikörperbindungs-Hemmungstest bei Rind 2

AK Bd 1

AK Bd 2



Der Ausgangstitel des Rinds Nr. 2 betrug 1:16. Im ELISA zeigte sich ab dem 5. Tag p.i. ein Anstieg um 2 Stufen auf 1:64. Am 6. Tag p.i. erhöhte sich der Wert auf 1:128 und erreichte sein Maximum 9 Tage p.i. mit 1:256 (Abb. 2). Danach sank er wieder auf 1:128, stieg zwischen dem 26. und 31. Tag p.i. nochmals auf 1:256 an und pendelte sich bis zum Versuchsende zwischen 1:64 und 1:128 ein.

Die Untersuchung von Seren des latent infizierten Rindes (Rind 3) ergab Antikörpertiter von 1:64 und 1:128 nach 12, 15 und 20 Monaten p.i.. Zu den gleichen Daten gelang im Tierversuch mit Gerbils die Isolierung von *B. divergens* aus dem Blut dieses Tieres. 73 Tage p.i. konnte ich ebenfalls im Tierversuch mit Gerbils aus dem Blut der 2 von mir infizierten Rinder *Babesien* isolieren.

Der Nachweis zirkulierender Antigene gelang mit der direkten serologischen Methode nicht. Negative Kontrollseren sowie die Seren der experimentell infizierten Rinder vor und nach der Infektion ließen keine Unterschiede der Reaktionen in den Platten erkennen; alle Seren reagierten wiederholt in allen Titernstufen mit gleich hohen Extinktionswerten. Die Verdünnung des Hochimmunsersums mit Phosphatpuffer (pH 7,2), dem höhere Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA), nämlich 1,2,4 und 5 % zur Vermeidung unspezifischer Anlagerungen zugesetzt waren, sowie die Inkubation der serumbeschichteten Platten mit einem 4 % BSA enthaltenden Puffer (pH 7,2) vor dem Einfüllen des HIS brachten keine besseren Ergebnisse. Dagegen gelang es, im Antikörperbindungs-Hemmungstest, den ich als zweite serologische Nachweismethode einsetzte, zirkulierende Antigene im Serum von Rind 2 nachzuweisen. Schon einen Tag nach der Infektion war die Extinktion des Serums mit 0,713 deutlich erniedrigt gegenüber dem als Kontrolle dienenden, entsprechend verdünnten Hochimmuns Serum (HIS), das eine Extinktion von 0,865 hatte. Ebenso war die Extinktion des vor der Infektion gewonnenen Serums mit 1,033 wesentlich höher (Abb. 2). Die niedrigste Ex-

tinktion wurde am 4. Tag p.i. mit 0,498 gemessen, was entsprechend der Eichkurve einer Konzentration von 7 - 8 µg Antigen/ml Serum entspricht (Abb. 1). Am 8. Tag p.i. hatte die Extinktion wieder den Wert des vor der Infektion gewonnenen Serums erreicht, der nur durch einen deutlichen Abfall (Ext. 0,710) am 11. Tag p.i. unterbrochen wurde.

Beim Rind 1 konnte ich nur am ersten Tag nach der Infektion eine deutliche Verringerung der Extinktion feststellen. Der Wert lag bei 0,610; dies entspricht einem Antigengehalt von 2 - 3 µg/ml Serum. Danach stieg die Extinktion der Seren auf Werte an, die demjenigen des Kontrollserums (HIS) entsprachen und während der Versuchsdauer in dieser Höhe persistierten.

In Seren des latent infizierten Rindes 3 konnte ich keine zirkulierenden Babesienantigene nachweisen.

2. Untersuchung von Feldseren aus bestimmten Gebieten Südbayerns auf zirkulierende Antikörper und Antigene

Zur Untersuchung der 1685 Seren aus 65 Betrieben auf Babesienantikörper mit Hilfe der ELISA-Technik verwendete ich sowohl somatische B. rodhaini- als auch B. divergens-Antigené, die beide gleichtitrige Ergebnisse bei den Seren der experimentell infizierten Rinder gezeigt hatten. Bei der Untersuchung auf Antikörper zeigten 1183 (70,2 %) Seren Titer von 1:64 und darunter. Von den 502 (29,8 %) positiv reagierenden Seren hatten 250 einen Titer von 1:128, 151 einen Titer von 1:256 und 101 Seren zeigten noch bei einem Titer von 1:512 Reaktionen (Tab. 1).

Untersuchte Seren 1685	Titer	Anzahl	%
negativ	≤ 1:64	1183	70,2
positiv	1:128	250	14,8
	1:256	151	9,0
	1:512 u. höher	101	6,0
insgesamt positiv		502	29,8

Tab. 1: Verteilung der Titerstufen bei 1685 auf Babesien-Antikörper im ELISA untersuchten Rinderseren aus Südbayern

Die 1685 untersuchten Seren verteilten sich auf 7 Landkreise Südbayerns (Tab. 2). Den höchsten Anteil positiv reagierender Seren hatten die Landkreise Oberallgäu (35,3 %) und Traunstein (34,5 %). Die niedrigste Infektionsrate bestand im Landkreis Rosenheim (15,5 %).

Landkreis	Anzahl der untersuchten Seren	davon positiv	%
Oberallgäu	235	83	35,3
Traunstein	206	71	34,5
Berchtesgadener Land	259	86	33,2
Rottal-Inn	241	75	32,1
Bad Tölz	212	68	32,1
Ingolstadt (Eichstätt)	248	75	30,2
Rosenheim	284	44	15,5

Tab. 2: Anzahl der im ELISA auf Babesien-Antikörper untersuchten Rinderseren aus 7 Landkreisen Südbayerns

Bei der Untersuchung der ausgewählten Feldseren gelang es mir nicht, zirkulierende Babesienantigene nachzuweisen. Die Extinktionen der untersuchten Seren lagen beim Antikörperbindungs-Hemmungstest in Höhe des Kontrollhochimmunserums. Den direkten Antigennachweis wandte ich bei den Feldseren nicht an.

Im Frühjahr 1980 versuchte ich mit Frischblut von Rindern aus dem Landkreis Oberallgäu die Isolierung von *Babesia divergens* im Tierversuch mit Gerbils. Blutproben von 30 vorwiegend 2 - 3jährigen Rindern, die im Sommer 1979 auf der Weide, teilweise auf Almen mit Zeckenbiotopen waren, wurden auf Gerbils i.p. (2ml) verimpft. Gleichzeitig untersuchte ich die Seren im ELISA auf zirkulierende Antigene und Antikörper.

Mit dem Antikörperbindungs-Hemmungstest konnte ich in den Seren kein Babesienantigen nachweisen; auch im Antikörpernachweis zeigten die Seren nur unspezifische Reaktionen. Auch in gefärbten Blutaussstrichen der beimpften Gerbils konnte ich keine Babesien finden. Diese Versuchstiere zeigten auch keine Krankheitserscheinungen und lebten noch 4 - 5 Monate nach der Beimpfung mit Blut. Im Oktober 1980 sammelte ich nochmals Blutproben aus 5 Betrieben im Oberallgäu. Bei diesen Betrieben hatte ich im ELISA mehrere Tiere mit Antikörpertitern festgestellt. Diese 26 Tiere waren im Sommer erstmals auf Almen gesömmert wurden. 6 - 8 Stunden nach der Blutentnahme beimpfte ich je ein Gerbil pro Probe mit 2 ml Blut. Die Tierversuche sowie der Antigennachweis verliefen negativ. Im Antikörpernachweis erreichte ein Serum einen Titer von 1:256, die übrigen Seren waren negativ.

IV. Diskussion der Ergebnisse

Ziel meiner Arbeit war es, mit Hilfe des Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) an 2 experimentell mit *Babesia divergens* infizierten Rindern die Antikörperbildung gegen diese Parasiten zu studieren und zu versuchen, zirkulierende Antigene (Stoffwechselprodukte) im Serum der Versuchstiere nachzuweisen. Anhand von 1685 Rinderseren aus ausgewählten Landkreisen Südbayerns sollten die experimentell erarbeiteten Grenztiter (für den Antikörpernachweis) und die Extinktionswerte (für den Nachweis zirkulierender Antigene) auf ihre mögliche Anwendbarkeit und Aussagekraft bei Felduntersuchungen überprüft werden.

Die Untersuchung der Seren von Rind 1 und Rind 2 vor der Infektion und die von negativen Kontrollseren auf Babesienantikörper ergab im ELISA sowohl mit *B. divergens*- als auch mit *B. rodhaini*-Antigenen Titerstufen bis zu 1:64. Da es sich hierbei um unspezifische Reaktionen handeln muß, bewertete ich nur Seren, die einen höheren Titer zeigten, also $\geq 1:128$, als babesienspezifisch positiv. REIF (1980) hatte bei seinen Untersuchungen aufgrund experimenteller Studien einen Grenztiter von 1:64 festgesetzt und Seren ab 1:64 als positiv bewertet. Als Antigen benutzte REIF (1980) die nach säulenchromatographischer Auftrennung des somatischen Extraktantigens von *B. rodhaini* erhaltene Fraktion 2, die sich durch starke Antigenität auszeichnete, während ich das somatische Extraktantigen von *Babesia rodhaini* und *B. divergens* ohne vorherige Auftrennung in Form des Rohantigens verwendete. Mit beiden Antigenen erzielte ich bei Vergleichsuntersuchungen gleiche Titer. Die somatischen Extraktantigene von *B. rodhaini* und *B. divergens* haben gemeinsame Antigenkomponenten, die in serologischen Tests zu Kreuzreaktionen führen. Auch REIF (1980) konnte in der indirekten Hämagglutination gleiche Titer mit homologen (*B. divergens*) und heterologen (*B. rodhaini*) Antigenen erzielen.

Desgleichen stellten WEILAND und DOHNA (1978) Kreuzreaktionen zwischen *Babesia rodhaini*, *B. galagolata* und *B. canis* fest. KRATZER (1979) konnte im ELISA serologische Kreuzreaktionen von *B. rodhaini*-Antigenen mit Hochimmun- und Infektionsseren gegen *B. canis*, *B. galagolata*, *B. microti*, *B. musculi*, *B. bigemina*, *B. divergens* und *B. caballi* beobachten. Die Ergebnisse meiner serologischen Untersuchungen sowie die der zitierten Autoren lassen den Schluß zu, daß zumindest mit den verwendeten Antigenen eine Serodiagnose über die Gattungsspezifität hinaus nicht möglich ist.

Anstiege der Antikörpertiter gegenüber den Leerwerten konnte ich zwischen dem 6. Tag und dem 9. Tag p.i. nachweisen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von REIF (1980), der mit dem ELISA erstmals 5 Tage p.i. und 3 Tage nach Beginn der Parasitämie Antikörper bei mit *B. divergens* infizierten Rindern feststellen konnte. Auch BIDWELL und Mitarb. (1978) wiesen im ELISA bei mit *B. divergens* bzw. *B. major* infizierten Kälbern am 6. Tag nach der Infektion Antikörper nach.

Die Antikörpertiter stiegen danach an und erreichten zwischen dem 9. (Rind 2) und dem 13. (Rind 1) Tag maximale Werte. Nach einem Abfall um eine Stufe erreichten die Titer beim Rind 2 wieder den Höchstwert von 1:256 zwischen dem 26. und 31. Tag p.i.. Dagegen hatte REIF (1980) die höchsten Titer im ELISA zwischen dem 17. und 34. Tag nach der Infektion festgestellt. Allerdings hatte er auch höhere Maximaltiter (1:512 - 1:1024) bei 2 seiner experimentell infizierten Rinder nachweisen können. Eines der 3 infizierten Rinder, das nur einen Titer von 1:256 erreichte, zeigte diese Titerhöhe schon 17 Tage p.i.. Bei Infektionsversuchen mit *B. divergens* an Rindern konnten BIDWELL und Mitarb. (1978) im ELISA die höchsten Werte, die sie in Extinktionen angaben, um den 20. Tag nach der Infektion feststellen.

Bald nach Erreichen der Maximaltiter in Höhe von 1:128 bis 1:256 fielen die Titer wieder ab und hielten sich bis Versuchsende auf niedrigen positiven Werten. Bei dem latent infizierten Rind konnten auch 20 Monate nach der Infektion noch Antikörper nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen machte REIF (1980). Ihm gelang es, sowohl im IFAT und im IHA als auch im ELISA über einen Zeitraum von 250 Tagen spezifische Antikörper nachzuweisen. Auch ROSS und LÖHR (1968) konnten mit dem IFAT, CURNOW und CURNOW (1967) mit dem IHA sowie PURNELL und Mitarb. (1976) mit dem ELISA noch lange Zeit nach einer einmaligen Infektion Antikörper feststellen.

Bei der Untersuchung von 1685 Rinderseren aus 7 Landkreisen des südbayerischen Voralpenlandes zeigten 502 Seren (29,8 %) positive Antikörpertiter. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von REIF (1980), der von 1291 untersuchten Seren aus den gleichen Landkreisen bei 26 % positive Reaktionen im ELISA feststellte. In den Landkreisen Oberallgäu und Traunstein reagierten die meisten Seren positiv (35,3 % bzw. 34,5 %). Im Landkreis Rosenheim dagegen konnten nur bei 15,5 % der untersuchten Seren positive Antikörpertiter nachgewiesen werden. Auch REIF (1980) fand im Landkreis Oberallgäu die höchste, im Landkreis Rosenheim die geringste Infektionsrate. Bei Vergleichsuntersuchungen mit dem IHA konnte er mit dem homologen B. divergens-Antigen bei 23,1 % und mit dem heterologen B. rodhaini-Antigen bei 24,2 % der Seren Antikörper feststellen. ADAM und BLEWETT (1978) wiesen nur bei 11 % von 22044 Rinderseren aus Schottland Antikörper im IFAT nach. Doch reagierten in den als Zeckenbiotopen bekannten schottischen Highlands bis zu 40 % der untersuchten Seren positiv. Da in den ausgewählten Landkreisen Südbayerns solche Zeckenbiotope vorkommen, lassen sich Parallelen zu den Ergebnissen der schottischen Autoren ziehen.

Da negative Kontrollseren gleiche Reaktionen wie die Seren der ex-

perimentell mit *B. divergens* infizierten Rinder zeigten, konnte ich mit dem direkten Antigennachweis keine befriedigenden Ergebnisse erzielen. Die Zugabe von bovinem Serumalbumin in verschiedenen Konzentrationen brachte keine deutlichen Ergebnisse, obwohl so unspezifische Proteinablagerungen gemindert oder vermieden werden können. Auch die Inkubation der serumbeschichteten Platten mit 4 %-iger BSA-Lösung brachten keine anderen Ergebnisse. Der Ersatz von BSA durch Humanserumalbumin (HSA) in den verwendeten Puffern zeigte keinen Erfolg. Um unspezifische Reaktionen der Seren mit dem HIS zu verringern, verwendete ich die nach der säulenchromatographischen Auftrennung des HIS gewonnene IgG-Fraktion im ELISA. Daraufhin traten zwar nicht mehr so hohe Extinktionswerte auf, deutliche Unterschiede zwischen den negativen Kontrollseren und den Seren der 3 infizierten Rinder waren jedoch nicht festzustellen. Es scheint in der Platte zu unspezifischen Komplexbildungen zwischen gebundenen Serumproteinen und Proteinen des Hochimmunserums zu kommen, an die das markierte Antikaninchenglobulin gebunden wird. Damit bleibt in der Platte Enzym zurück, welches das Substrat umsetzt.

Mit dem Antikörperbindungs-Hemmungstest gelang mir bei einem Rind während der frischen Infektionsphase der Nachweis zirkulierender Babesienantigene; dies war jedoch kurz nach der Parasitämie nicht mehr möglich. Vergleichbare Beobachtungen machten SIBINOVIC und Mitarb. (1965) bei einem Pferd mit akuter Babesiose, verursacht durch *B. caballi*. Sie konnten mit Hilfe der Doppelgelddiffusion *B. caballi*-Antigen im Serum nachweisen; dies verschwand allerdings nach einem Monat aus dem Serum. 3 Monate nach der Infektion stellten sie Antikörper gegen dieses im Serum zirkulierende Antigen fest, die ca. 7 Monate persistierten. Auch MAHONEY (1966) fand im Serum entmilzter, massiv mit *B. argentina* bzw. *B. bigemina* infizierter Kälber Babesienantigene in der Geldiffusion. ARAUJO (1976) wies bei akut mit *Trypanosoma cruzi* infizierten Mäusen mittels Counterimmunoelektrophorese ab dem 5. Tag p.i. zirkulierende Antigene nach, die bis zum Eingehen der Tie-

re am 12. Tag vermehrt auftraten. Dem Autor gelang es jedoch nicht, im Serum latent infizierter Mäuse Exoantigene festzustellen. Bei experimentell mit *T. cruzi* infizierten Mäusen, stellten ARAUJO, NASCIMENTO und MORATO (1978) eine Korrelation zwischen der im Serum zirkulierenden Antigenmenge und der Höhe der Parasitämie fest. Auch bei der Toxoplasmose des Menschen konnten ARAUJO und REMINGTON (1980) im ELISA nur während der frischen Infektionsphase zirkulierende Toxoplasmaantigene feststellen. In Seren von latent infizierten Patienten gelang es ihnen nicht, spezifische Antigene nachzuweisen.

Da wahrscheinlich aufgrund der geringen Infektionsdosis bei dem mit Babesien-haltigen Erythrozyten infizierten Rind 1 keine Parasitämie festzustellen war, ferner nur ein geringer Titeranstieg erfolgte, scheint die Infektion bald in das latente Stadium, in dem auch beim Rind 2 keine spezifischen Antigene im Serum nachzuweisen waren, übergegangen zu sein. Im Serum von Rind 3, bei dem ab dem 27. Tag p.i. keine Erreger mehr im Blutaussstrich nachgewiesen werden konnten, gelang es auch nicht, zirkulierendes Antigen nachzuweisen. Mit dem Antikörperbindungs-Hemmungstest konnten Antigenkonzentrationen ab 2 - 3 µg/ml sicher nachgewiesen werden, was der experimentelle Ansatz erwiesen hatte. Dies entspricht etwa der Empfindlichkeit, wie sie FERREIA und Mitarb. (1979) mit der ELISA-Sandwich-Technik bei dem Nachweis zirkulierender *Schistosoma mansoni*-Antigene im Serum infizierter Mäuse erreichten. Sie konnten *S. mansoni*-Proteinantigene in einer Konzentration von 6 µg/ml und *S. mansoni*-Polysaccharidantigene in einer Konzentration von 3 µg/ml feststellen.

Sobald Antikörper im Serum festzustellen waren, wurde die Antigenmenge geringer und war bald darauf nicht mehr nachzuweisen. Das im Serum zirkulierende Antigen wird wahrscheinlich von den sich bildenden Antikörpern so komplex gebunden, daß es keine freie Bindungsstelle mehr hat, an die sich bei der Inkubation des Serums

mit dem Hochimmunserum spezifische Antikörper aus dem HIS anlagern können. Diese Ansicht wird dadurch bestärkt, daß im Antikörperbindungs-Hemmungstest keine Unterschiede bei antigenpositiven Seren festzustellen waren, ob sie nun nach der Inkubation mit dem Hochimmunserum zentrifugiert oder nicht zentrifugiert worden waren. Auch bei der Erstellung der Eichkurve für den Antikörperbindungs-Hemmungstest mit definierten Mengen Antigen waren die Ergebnisse mit und ohne Zentrifugieren gleich.

Diese Ergebnisse bei der Erstellung der Eichkurve zeigen auch, daß immer Antikörper im Überschuß zu der Antigenverdünnung gegeben worden waren; es konnten noch Extinktionen bei den einzelnen Antigenkonzentrationen gemessen werden. Ein Antikörperüberschuß scheint also die Bindungsstellen des Antigens so abzusättigen, daß keine weiteren Antigen-Antikörper-Reaktionen möglich sind. Im Serum latenter infizierter Tiere sind Antikörper noch zu Reaktionen mit spezifischem Antigen fähig, was die Möglichkeit des Nachweises von Antikörpern in diesem Infektionsstadium beweist. Es sind also genügend Antikörper im Serum vorhanden, die darin befindliches zirkulierendes Antigen so binden können, daß es beim Antikörperbindungs-Hemmungstest nicht mehr mit den Antikörpern des Hochimmunserums reagieren kann. Darauf ist es sicherlich zurückzuführen, daß der Antigennachweis bei den untersuchten Feldseren mißlang. Diese Seren waren während der Stallperiode in den Monaten Januar bis April gesammelt worden, in einer Zeit also, in der während der vorhergegangenen Weideperiode (Mai-Oktober) frisch mit *Babesia divergens* infizierte Rinder sicher schon das latente Infektionsstadium erreicht hatten.

Es sind weitere Untersuchungen über zirkulierende Antigene und Antigen-Antikörper-Komplexe bei mit *B. divergens* infizierten Rindern notwendig; nur so sind Aufschlüsse über den Infektionsstatus

eines Tieres zu erhalten. Es muß aber ein Rind ohne Antikörpertiter nicht unbedingt parasitenfrei sein, sondern es kann sich in der frischen Infektionsphase befinden; ebenso wenig kann von einem Antikörpertiter auf eine bestehende Infektion eines Tieres geschlossen werden, da nach einer erfolgreichen Therapie noch monatelang Antikörper nachgewiesen werden können. So wies REIF (1980) bei 2 mit *B. divergens* infizierten Rindern noch mindestens 70 Tage nach einer Behandlung mit $3 \times 7,5$ mg/kg Berenil Antikörper nach, obwohl er aus dem Blut dieser Tiere durch Inokulation in Gerbils *Babesien* nicht isolieren konnte; dies gelang ihm jedoch bei einem unbehandelten Rind noch 243 Tage p.i..

Die Empfänglichkeit von Gerbils (*Meriones unguiculatus*) für *B. divergens*, diese *Babesien*art war vorher als rinderspezifisch angesehen worden, entdeckten LEWIS und WILLIAMS (1979). Sie infizierten die Gerbils mit Rinderblut, das mit *B. divergens* parasitiert war. Je Gerbil injizierten sie ungefähr 5×10^8 befallene Erythrozyten. Im Blut der 3 mir zur Verfügung gestandenen und mit *B. divergens* infizierten Rinder waren dagegen keine Parasiten zum Zeitpunkt der Blutübertragung auf Gerbils festzustellen. Dennoch gelang aus allen 3 Rindern eine *Babesien*-isolierung. Die infizierten Gerbils zeigten 4 Tage p.i. eine Parasitämie ($600 - 800^0/00$); die Infektion führte schließlich 12 - 14 Tage p.i. zum Tod der Tiere. Gleiches hatte REIF (1980) beobachtet, der mit dem Blut von 3 experimentell mit *B. divergens* infizierten Rindern während der latenten Infektionsphase eine Infektion bei Gerbils setzte. Bei 2 Rindern, die vor der Blutübertragung mit $3 \times 7,5$ mg/kg Berenil im Abstand von 2 Tagen behandelt worden waren, gelang ihm die Infektion von Gerbils nicht (Beweis für den Behandlungserfolg).

Babesia divergens kann also durch Inokulation in Gerbils aus dem Blut latent infizierter Rinder isoliert werden. Der Versuch, Gerbils mit Blutproben von Rindern aus dem Landkreis Oberallgäu zu infizieren und damit einen direkten Erregernachweis zu führen, schlug fehl. Aller-

dings konnten in den Seren der 30 Blutproben, die im April genommen wurden, auch keine Antikörper gegen *B. divergens* nachgewiesen werden. Da aber latent infizierte Rinder zumindest niedrige Antikörpertiter aufweisen, muß davon ausgegangen werden, daß die untersuchten Rinder keine Parasitenträger waren, da zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme mit keiner akuten Infektion zu rechnen war. Daß auch aus dem Blut eines der 26 im Oktober untersuchten Rinder, das einen Antikörpertiter von 1:256 aufwies, keine Babesien isoliert wurden, könnte daraufhin deuten, daß dieses Rind mit einer anderen, nicht für Gerbils empfänglichen Babesienart infiziert war. So konnten AESCHLIMANN, BROSSARD und QUENET (1975) bei Untersuchungen in der Schweiz 3 Babesienarten, nämlich *Babesia major*, *B. divergens* und *B. bovis* isolieren. Auch BROSSARD und AESCHLIMANN (1975) stellten fest, daß die Babesiose der Rinder in der Südschweiz von mindestens 2 Babesienarten (*B. divergens* und *B. major*) hervorgerufen wurde.

Die Ergebnisse im ELISA waren nicht immer reproduzierbar. Verschiedene Plattenchargen erbrachten Unterschiede von 1 - 2 Titerstufen; dabei trat vor allem das "Eckenphänomen" auf; in den äußeren Kavitätenreihen der Mikroelisaplatten waren die Extinktionen höher als in den übrigen Kavitäten. Auch Vergleichstests mit Platten verschiedener Firmen ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Die ELISA-Ergebnisse sollten daher nicht zum absoluten Maßstab genommen werden, vor allem durch andere ergänzende serologische Tests bewertet werden.

V. Zusammenfassung

Von 2 experimentell mit *Babesia divergens* infizierten Rindern wurden Verlaufskurven der Antikörpertiter im Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) erstellt und 2 Nachweismethoden für zirkulierendes Babesienantigen in der ELISA- Technik getestet. Unter Verwendung von somatischen homologen *B. divergens*- und heterologen *B. rodhaini*- Antigenen konnten bei experimentell infizierten Rindern spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Antikörperbindungs- Hemmungstests gelang im Serum eines Rindes in der frischen Infektionsphase der Nachweis von Babesienantigen.

Bei der Untersuchung auf Antikörper von 1685 Rinderseren aus 7 Landkreisen Südbayerns reagierten im ELISA 502 Seren (29,2 %) positiv; dabei war die Durchseuchungsrate in den einzelnen Landkreisen unterschiedlich hoch. Die Versuche, zirkulierendes Antigen in den Feldseren festzustellen, mißlangen.

Die Isolierung von *B. divergens* durch Inokulation von Blutproben in Gerbils gelang bei 3 Rindern während der latenten Infektion 73 Tage bis 20 Monate p.i.. Versuche, *B. divergens* aus Rinderblutproben aus babesioseverdächtigen Beständen zu isolieren, schlugen fehl.

RAUCH, J.: Investigations on the incidence of antibodies and circulating antigens in experimentally Babesia divergens infected and in babesiosis suspected cattle by means of the enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)

Summary

In two calves, experimentally infected with Babesia divergens, the course of antibody-formation was investigated by means of the enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) and two methods for the detection of circulating antigen were tested with the ELISA-technique. Using somatic homologous B. divergens as well as heterologous B. rodhaini antigen, specific antibodies could be detected in experimentally infected cattle. Babesial antigen could be detected in the early phase of infection of one calve by means of the antibody-binding-inhibition-test.

Screening of 1685 sera of cattle originating from 7 rural districts of South Bavaria gave positive results in 502 cases (29,2%), whereby the frequency was different in different districts.

The demonstration of circulating antigens failed in those sera of the field survey. The isolation of B. divergens by inoculation of fresh blood samples of 3 latent infected cattle was successful 73 days to 20 months post infection, the isolation, however, failed with blood samples from Babesia suspected herds.

VI. Literaturverzeichnis

- Adam, K.M., D.A. Blewett (1978): A serological survey for Babesia in cattle in Scotland. I. Assessment of the method by the results from the outlying islands.
Ann. Trop. Med. Parasit. 72, 405-415
- Adam, K.M., D.A. Blewett (1978): A serological survey for Babesia in cattle in Scotland. II. The occurrence of antibody in the population and the distribution of infected herds.
Ann. Trop. Med. Parasit. 72, 417-428
- Aeschlimann, A., M. Brossard, G. Quenet (1975): Contribution a la connaissance de piroplasmes de Suisse
Act. Trop. 32, 281-289
- Ambroise-Thomas, P., P.T. Desgeorges (1978): Diagnostic immuno-encymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée.
Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé 56, 609-613
- Ambroise-Thomas, P., P.T. Desgeorges, M. Bouttaz (1980):
Le diagnostic immuno-encymologique (ELISA) de la fasciolose humaine et bovine.
Détection d'anticorps et / ou d'antigenes circulants.
Ann. Soc. belge Med. trop. 60, 47-60
- Araujo, F.G. (1976): Circulating antigens in mice acutely infected with Trypanosoma cruzi: Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 18, 138
- Araujo, F.G., E. Nascimento, M.J.F. Morato (1978): Immunization and enhancement properties of the circulating antigens of Trypanosoma cruzi.
Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 534-536
- Araujo, F.g., J.S. Remington (1980): Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis
J. infect. Dis. 141, 144-150
- Bawden, M.P., T.H. Weller (1974): Schistosoma mansoni antigen: detection by complement fixation in sera from infected hamsters and mice.
Ann. J. Trop. Med. Hyg. 23, 1077-1084
- Berggren, W.L., T.H. Weller (1967): Immunoelktrophoretic Demonstration of specific circulating antigen in animals infected with Schistosoma mansoni.
Ann. J. Trop. Med. Hyg. 16, 606-612

- Bidwell, D.E., P. Turp, L.P. Joyner, R.C. Payne, R.E. Purnell (1978): Comparison of serological tests for Babesia in British cattle. Vet. Rec. 103, 446-449
- Blewett, D.A., K.M. Adam (1978): A serological survey for Babesia in cattle in Scotland. III. The rates of acquisition and loss of antibody to Babesia and their effects on observed levels of antibody incidence. Ann. Trop. Med. Parasit. 72, 513-522
- Brossard, M., A. Aeschlimann (1975): Piroplasmoses bovines en Suisse italienne (Remarques sur les infections latentes). Schweiz. Arch. Tierheilk. 117, 287-292
- Bullock, S.L., K.W. Walls (1977): Evaluation of some of the parameters of the enzyme-linked immunospecific assay. J. infect.Dis. 136, 279-285
- Curnow, J.A., B.A. Curnow (1967): An indirect haemagglutination test for the diagnosis of Babesia argentina infection in cattle. Austr. Vet. J. 43, 286-290
- D'Allesandro, P.A. (1972): Trypanosoma lewisi: Production of exoantigens during infection in the rat. Exp. Parasit. 32, 149-164
- Donnelly, J.I., L.P. Joyner, P.J. Crossmann (1972): The incidence of Babesia divergens infection in a herd of cattle as measured by the indirect immunofluorescent antibody test. Res. Vet. Sci. 13, 511-514
- Dwyer, D.M. (1977): Immunochemical identification of Trypanosoma lewisi exoantigens as surface membrane constituents. Abstr. pap. 5th Int. Congr. Protocol, New York City, USA 240
- Engvall, E., P. Perlmann (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol. 109, 129-135
- Felgner, P. (1978): Stepless antibody determination with the Stick-ELISA technique. Results expressed as multiple of normal activity (MONA). Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 242, 100-105
- Ferreira, A.W., A.L.M. Caldini, S. Hoshino-Shimizu, M.E. Camargo (1979): Immuno-enzymatic assay for the detection of Schistosoma mansoni antigens in Serum of mice harbouring bisexual or unisexual light worm infections. J. Helminthol. 53, 189-194

- Gold, R., F.S. Rosen, T.H. Weller (1969): A specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 18, 545-552
- Goldmann, M., E. Bukowsky (1975): Extraction and preliminary use for diagnosis of soluble precipitation antigens from *Babesia bigemina*.
J. Protozool. 22, 262-264
- Goodger, B.V. (1971): Preparation and assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis.
Austr. Vet. J. 47, 251-255
- Goodger, B.V., D.F. Mahoney (1974): Evaluation of the passive haemagglutination test for diagnosis of *Babesia argentina* in cattle.
Austr. Vet. J. 50, 246-249
- Gray, A. R. (1961): Soluble antigens of *Trypanosoma vivax* and of other trypanosomes.
Immunology 4, 253-261
- Hillyer, G.V. (1976): Schistosome antigens in the circulation of Chimpanzees infected with *Schistosoma japonicum*
Am. J. Trop. Med. Hyg. 25, 432-436
- Hirato, K., N. Ninomiya, Y. Uwano, T. Kutil (1945): Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmosis.
Jap. J. Vet. Sci. 7, 204-205
- Jacob, E. (1939): Die Verbreitung der Rinderpiroplasmose im Gau Niedersachsen.
Z. Infekt.-Kr. Haustiere 55, 117-133
- Joyner, L.P., J. Donnelly, R. Payne (1972): The indirect fluorescent antibody test for the differentiation of infections with *Babesia divergens* or *B. major*.
Res. Vet. Sci. 13, 515-518
- Kratzer, I. (1979): Die Brauchbarkeit der *Babesia rodhaini*-Antigene zum Nachweis von Babesien-Infektionen im ELISA.
Vet. med. Diss., München
- Lewis, D., H. Williams (1979): Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm *Babesia divergens*.
Nature 278, 170-171
- Löhr, K.F., J.P.J. Ross (1969): Capillary tube agglutination test for the detection of *Babesia bigemina* antibody.
Tropenmed. Parasit. 20, 287-292

- Lopez, G., R.A. Todorovic (1978): Rapid latex agglutination (RLA) test for the diagnosis of *Babesia argentina*.
Vet. Parasit. 4, 1-9
- Mackey, L., L. Perrin, E. Leemans, P.R. Lambert (1980):
The diagnosis of malaria infection using a solid-phase radioimmunoassay for the detection of malaria antigens.
Application to the detection of *Plasmodium berghei* infection in mice.
Parasitology 80, 171-182
- Madwar, M.A., A. Voller (1977): Serological investigations on patients with schistosomiasis with special reference to circulating antigen
Tropenmed. Parasitol. 28, 57-62
- Mahoney, D.F. (1962): Bovine babesiosis: diagnosis of infection by a complement fixation test.
Austr. Vet. J. 38, 48-52
- Mahoney, D.F. (1964): Bovine babesiosis: an assessment of the significance of complement fixing antibodies based upon experimental infection.
Austr. Vet. J. 40, 369-375
- Mahoney, D.F. (1966): Circulating antigens in cattle infected with *Babesia bigemina* or *B. argentina*
Nature 24, 422
- Mahoney, D.F. (1967): Bovine babesiosis: preparation and assessment of complement fixing antigens.
Exp. Parasit. 20, 232-241
- Mahoney, D.F. (1977): *Babesia* of domestic animals.
In: J.P. Kreier: Parasitic protozoa IV, 1-52. Academic Press, New York
- Mahoney, D.F., B.V. Goodger (1969): *Babesia argentina*:
Serum changes in infected calves.
Exp. Parasit. 24, 375-382
- Mayr, A., P.A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann (1977): Virologische Arbeitsmethoden. II. Serologie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Purnell, R.E., D.J. Hendry, D.E. Bidwell, P. Turp (1976): Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Babesia divergens* in cattle.
Vet. Rec. 99, 102-105
- Raizman, R.E., F.A. Neva (1975): Detection of circulating antigen in acute experimental infections with *Toxoplasma gondii*.
J. Infect. Dis. 132, 44-48

- Reif, L. (1980): Der serologische Nachweis der Babesia divergens-Infektion des Rindes mit der Immunfluoreszenz, der indirekten Hämagglutination und dem Immuno-Enzymtest.
Vet. med. Diss., München
- Ristic, M., S. Sibinovic (1964): Serologic diagnosis of Babesia bigemina infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test.
Res. Vet. Sci. 9, 557-562
- Rosenberger, G. (1970): Krankheiten des Rindes.
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- Ross, J.P.J., K.F. Löhr (1968): Serologic diagnosis of Babesia bigemina infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test.
Res. Vet. Sci. 9, 557-562
- Ruitenbergh, E.J., F. van Knapen (1977): The enzyme-linked immunosorbent assay and its application to parasitic infections.
J. infect. Dis. 136, 267-273
- Santoro, F., B. Vandenmeulebroucke, A. Capron (1979): Schistosoma mansoni: Circulating antigens and immune complexes in infected mice.
Exp. Parasit. 47, 392-402
- Seitz, H.M. (1976): The Plasmodium berghei infection in isogenic F₁ (57BLxDBA) mice: II. Antibodies and antigens in the serum.
Tropenmed. Parasitol. 27, 33-43
- Sibinovic, K.H., M. Ristic, S. Sibinovic, T.N. Phillips (1965): Equine babesiosis: isolation and serologic characterization of a blood serum antigen from acutely infected horses.
Am. J. Vet. Res. 26, 147-153
- de Siqueira, A.F., F. Febriolli, I. da R. Carneiro (1966): Soluble antigen present in the serum of rats infected with Trypanosoma cruzi-Preliminary note.
Revista do Inst. de Med. Trop. de Sao Paulo 8, 148
- Todorovic, R.A., K.L. Kuttler (1974): Babesiosis card agglutination test.
Am. J. Vet. Res. 35, 1347-1350
- Todorovic, R.A. (1975): Serological diagnosis of babesiosis: A review.
Trop. Anim. Hlth Prod. 7, 1-14
- Todorovic, R.A., R.F. Long (1976): Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for the diagnosis of Babesia spp. infections in Colombian cattle.
Tropenmed. Parasit. 27, 169-181

- Weiland, G., H. Graf zu Dohna (1978): Die Brauchbarkeit des Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) zum Nachweis von Babesien-Antikörpern in Hochimmunseren mit Hilfe von Ektoantigenen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 33-35
- Weiland, G. (1978): Der Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) als neue serodiagnostische Methode zum Nachweis parasitärer Infektionen. Münch. Med. Wschr. 120, 1457-1460
- Weitz, B.G.F. (1960 a): A soluble protective antigen of *Trypanosoma brucei*. Nature 185, 788-789
- Weitz, B.G.F. (1960 b): The properties of some antigens of *Trypanosoma brucei*. J. Gen. Microbiol. 23, 589-600
- Wilson, R.J.M., I.A. McGregor, P. Hall, K. Williams, R. Bartholomew (1969): Antigens associated with *Plasmodium falciparum* infections in man. Lancet 2, 201-205
- Van Knapen, F., S.O. Panggabean (1977): Detection of circulating antigen during acute infections with *Toxoplasma gondii* by enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 6, 545-547.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die jederzeit freundliche Hilfe.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. G. Weiland für die wissenschaftliche Anleitung und seinen unermüdlichen Einsatz für das Fortkommen der Arbeit.

Für die in technischen Fragen stets gern geleistete Unterstützung möchte ich FrI. Sabine Wegerdt sehr herzlich danken.

Desgleichen bedanke ich mich bei Fr. M. Stöttner für das Schreiben der Arbeit.

Lebenslauf

Am 9. Dezember 1951 wurde ich als zweites Kind des Schmiedemeisters Johann Rauch und seiner Ehefrau Martha, geb. Tempel, in Wohnsig geboren.

Vom September 1958 an besuchte ich die Volksschule in Weismain und trat 1964 in das Franz-Ludwig-Gymnasium in Bamberg über, wo ich 1973 die Reifeprüfung ablegte.

Meinen Wehrdienst leistete ich vom 1. Juli 1973 bis zum 30. September 1974 ab.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, das ich im November 1979 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit Dezember 1979 bin ich am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit der Anfertigung meiner Dissertation beschäftigt.

